

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2) 204-209; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

(*R*)与(*S*)-羰基还原酶偶联一步法制备(*S*)-苯乙二醇

张荣珍, 徐岩*, 孙莹, 耿亚维

(江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要 【目的】通过(*R*)-和(*S*)-羰基还原酶在大肠杆菌中偶联, 实现了一步法制备(*S*)-苯乙二醇的生物转化过程。【方法】将来源于近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)的(*R*)-羰基还原酶基因(*rcr*)和(*S*)-羰基还原酶基因(*scr*)串联于共表达载体 pETDuet™-1 上。重组质粒 pETDuet-*rcr-scr* 转化稀有密码子优化型菌株 *Escherichia coli* Rosetta, 获得酶偶联重组菌株 *E. coli* Rosetta / pETDuet-*rcr-scr*。当重组菌体培养至 OD_{600} 0.6~0.8 时, 添加终浓度 1 mmol/L IPTG, 30°C 诱导蛋白表达 10 h。【结果】SDS-PAGE 结果表明(*R*)-和(*S*)-羰基还原酶均明显表达, 它们的相对分子质量分别为 37 kDa 和 30 kDa。重组菌生物转化结果表明在 pH7.0 的磷酸缓冲液中, 添加 5 mmol/L Zn^{2+} 时, 获得产物(*S*)-苯乙二醇, 产物光学纯度为 91.3% e.e., 产率为 75.9%。【讨论】采用分子重组技术成功整合了两种氧化还原酶的催化功能, 实现了(*S*)-苯乙二醇的一步法转化, 为简化手性醇制备途径提供了一条崭新的思路。

关键词: 羰基还原酶; 分子重组技术; 酶偶联体系; 生物转化; (*S*)-苯乙二醇

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0204-06

手性醇具有特殊的光电磁性能和生理活性, 是非常理想的液晶材料掺杂剂和手性药物的重要中间体^[1-2]。手性醇的制备方法有多种, 其中氧化还原酶立体选择性转化手性醇的方法具有环境友好、过程高效、成本低、污染轻等强大优势, 逐渐成为了国内外手性醇制备的主要发展趋势^[3]。如 Hummel 等利用来源于 *Lactobacillus kefir* 的醇脱氢酶催化立体选择性还原苯乙酮, 获得光学纯的(*R*)-1-苯乙醇^[4]。

近几年来, 随着多酶偶联技术的发展, 手性醇的生物制备技术取得了突破性的进展, 产物的生物转化效率也获得了大幅度的提高。如孙莹等将近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)的(*R*)-羰基还原酶与博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的甲酸脱氢酶偶联, 实现了高底物浓度下手性醇的高效制备, 产物(*R*)-苯乙二醇光学纯度高达 100%, 产率达

85.9%^[5]。Hyungdon 等报道由 ω -转氨酶、醇脱氢酶和葡萄糖脱氢酶组成的耦联体系高效转化生产(*R*)-苯乙醇^[6]。来源于 *C. parapsilosis* CCTCC M203011 的(*R*)-羰基还原酶(*RCR*)和(*S*)-羰基还原酶(*SCR*)具有不同的生物催化功能, 前者催化(*R*)-苯乙二醇获得产物 2-羟基苯乙酮^[7], 后者以 2-羟基苯乙酮为底物, 催化产生(*S*)-苯乙二醇^[8]。前期研究结果表明两种羰基还原酶的酶学性质和动力学特性表现出明显的差异^[8-9]。本研究利用基因工程方法, 将来源于 *C. parapsilosis* CCTCC M203011 的(*R*)-和(*S*)-羰基还原酶进行耦合, 构建双酶偶联体系, 两种酶的催化反应如图 1 所示。该酶偶联重组菌以高浓度的消旋苯乙二醇为底物进行生物转化反应, 实现了一步法高效制备(*S*)-苯乙二醇的转化过程, 为该手性醇的工业化生产奠定了较结实的研究基础。

基金项目: 国家 973 项目(2003CB716008)、国家 863 计划(2007AA02Z226、2006AA020104)、国家自然科学基金项目(20776060)、新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0498)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

作者简介: 张荣珍(1973-), 女, 江西奉新人, 在职博士, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: rzzhang666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-09-19; 修回日期: 2008-10-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

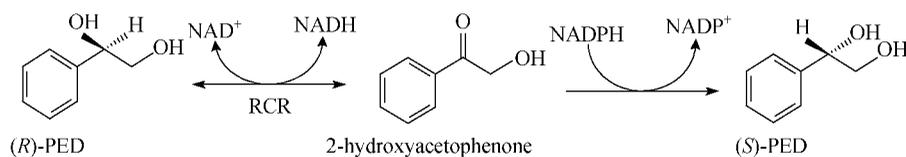
图1 两种羧基还原酶的催化反应^[8]

Fig.1 The reaction catalyzed by two different carbonyl reductases. RCR, (R)-specific carbonyl reductase; SCR, (S)-specific carbonyl reductase; (R)-PED, (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol; (S)-PED, (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 如表1所示。

1.1.2 主要试剂: Taq DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶、IPTG、基因组 DNA 提取试剂

盒、均购于 TaKaRa 生物有限公司,质粒提取和 DNA 回收试剂盒购于 OMEGA BIO-TEK。DNA Marker 购于天根生化科技有限公司。引物由上海赛百盛基因技术有限公司(SBS)合成。2-羟苯基乙酮按照 Liese 等^[1]方法合成,其余试剂均为国产分析纯。

表1 菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Candida parapsilosis</i>	Source of <i>rcr</i> and <i>scr</i> genes	This lab
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of pETDuet- <i>rcr</i>	This study
<i>E. coli</i> Rosetta	Host of pETDuet- <i>rcr-scr</i>	This study
Plasmids		
pETDuet TM -1	Amp ^r , two promoters, two multiple cloning sites (MCS), 5420 bp	Novagen Co.
pETDuet- <i>rcr</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>rcr</i> gene in pETDuet TM -1, 6.4 kb	This study
pETDuet- <i>rcr-scr</i>	0.8 kb DNA fragment with <i>rcr</i> gene in pETDuet- <i>rcr</i> , 7.2 kb	This study
<i>E. coli</i> Rosetta/ pETDuet- <i>rcr-scr</i>	Amp ^r and Cm ^r , recombinant strain harboring <i>rcr</i> and <i>scr</i> genes	This study

* Amp^r \leq 50 mg/L Amp, Cm^r \leq 34 mg/L Cm.

1.2 菌体培养

酵母培养基(g/L):葡萄糖 40,酵母膏 5, (NH₄)₂HPO₄ 13, KH₂PO₄ 7, ZnSO₄·7H₂O 0.3, NaCl 0.1, pH 7.0; LB培养基(g/L)胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0;使用前加入氨苄青霉素(50 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)。固体培养基添加 1.5% 琼脂粉。

将 *C. parapsilosis* 菌种接种于装有 50 mL 酵母培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 48 h。

1.3 基因组 DNA 的提取

将培养后的 *C. parapsilosis* 于 8000 \times g 离心 20 min, 用生理盐水洗涤 2 次后进行菌体收集, 用基因组 DNA 提取试剂盒 Genomic DNA Extraction Miniprep System(VIOGENE 公司)提取基因组。

1.4 *rcr* 和 *scr* 基因的获得

根据已经报道的 *C. parapsilosis* 的 *rcr* 和 *scr* 基因序列(Accession No. DQ675534 和 DQ295067)^[11-12], 利用 DNAMAN 软件设计引物如下: RCR_F: 5'-ATCGATCGCATATGTC AATTCCATCAAGCCAGTAC-3' (*Nde*I), RCR_R: 5'-TGACTCTCGAGTGGATTA AAAA CAACTCTACCTTC-3' (*Xho*I); SCR_F: 5'-ATCGAATTC

GATGGGCGAAATCGAATCTTATTG -3' (*Eco*RI) 和 SCR_R: 5'-TGACTGCGGCCGCTATGGACACGTGTA TCCACCGTC-3' (*Not*I)。采用 PCR 方法进行目的片段的扩增。PCR 反应采用 50 μ L 体系; PCR 反应条件 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 表达载体的构建

利用 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物。利用限制性内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 对基因 *rcr* 和 pETDuetTM-1 分别进行酶切, 酶切后回收的 DNA 片段通过粘性末端连接, 获得带有目的基因 *rcr* 的重组质粒 pETDuet-*rcr*。利用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Not*I 对基因 *scr* 和 pETDuet-*rcr* 分别进行酶切处理, 处理后 DNA 片段通过粘性末端连接, 获得带有 2 个目的基因 *rcr* 和 *scr* 的表达质粒 pETDuet-*rcr-scr*。重组质粒由上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 酶偶联重组菌的构建和蛋白表达

将重组质粒 pETDuet-*rcr-scr* 转化感受态细胞 *E. coli* Rosetta (DE3) 菌株, 涂布双抗平板(氨苄青霉素 50 mg/L, 氯霉素 34 mg/L), 从平板上挑取单菌落接种于含同样抗性的 LB 液体培养基中, 当菌体培

养的 OD_{600} 值达到 0.6~0.8 时,加入 1 mmol/L IPTG, 30℃ 诱导表达 10 h, SDS-PAGE 方法检测目的蛋白表达。

1.7 重组菌生物转化反应

在 1 mL 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 5.0~6.0)或磷酸缓冲液(pH 6.5~7.0)或 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5~8.0)中,加入 105 mmol/L 消旋苯乙二醇、0.1 g 湿菌体、加入 0~5 mmol/L 硫酸锌,混匀后于 30℃ 摇床反应 48 h;离心取上清反应液,用 2 mL 乙酸乙酯萃取,萃取液在 Chiralcel OB-H 柱上通过手性固定相高效液相色谱(HPLC)进行分析,根据峰面积计算得到产物(*S*)-苯乙二醇光学纯度 % e. e. 值及产率。(R)-和(*S*)-苯乙二醇的出峰时间分别为

13.9 min 和 16.9 min。

2 结果和分析

2.1 *rcr* 基因与 *fdh* 基因的钓取

以 *C. parapsilosis* 基因组为模板,以 RCR_F 和 RCR_R 为引物,进行 PCR 扩增反应,获得目的基因 *rcr*。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析其大小为 1.0 kb。以 SCR_F 和 SCR_R 为引物,从 *C. parapsilosis* 基因组 DNA 中,PCR 扩增出 *scr* 基因,凝胶电泳分析结果表明该基因片段条带单一,大小约为 0.8 kb。*rcr* 和 *scr* 基因大小均与文献报道相吻合^[11,13]。

2.2 pETDuet-*rcr*-*scr* 表达质粒的构建

用胶回收试剂盒对 *rcr* 和 *scr* 的 PCR 产物进行

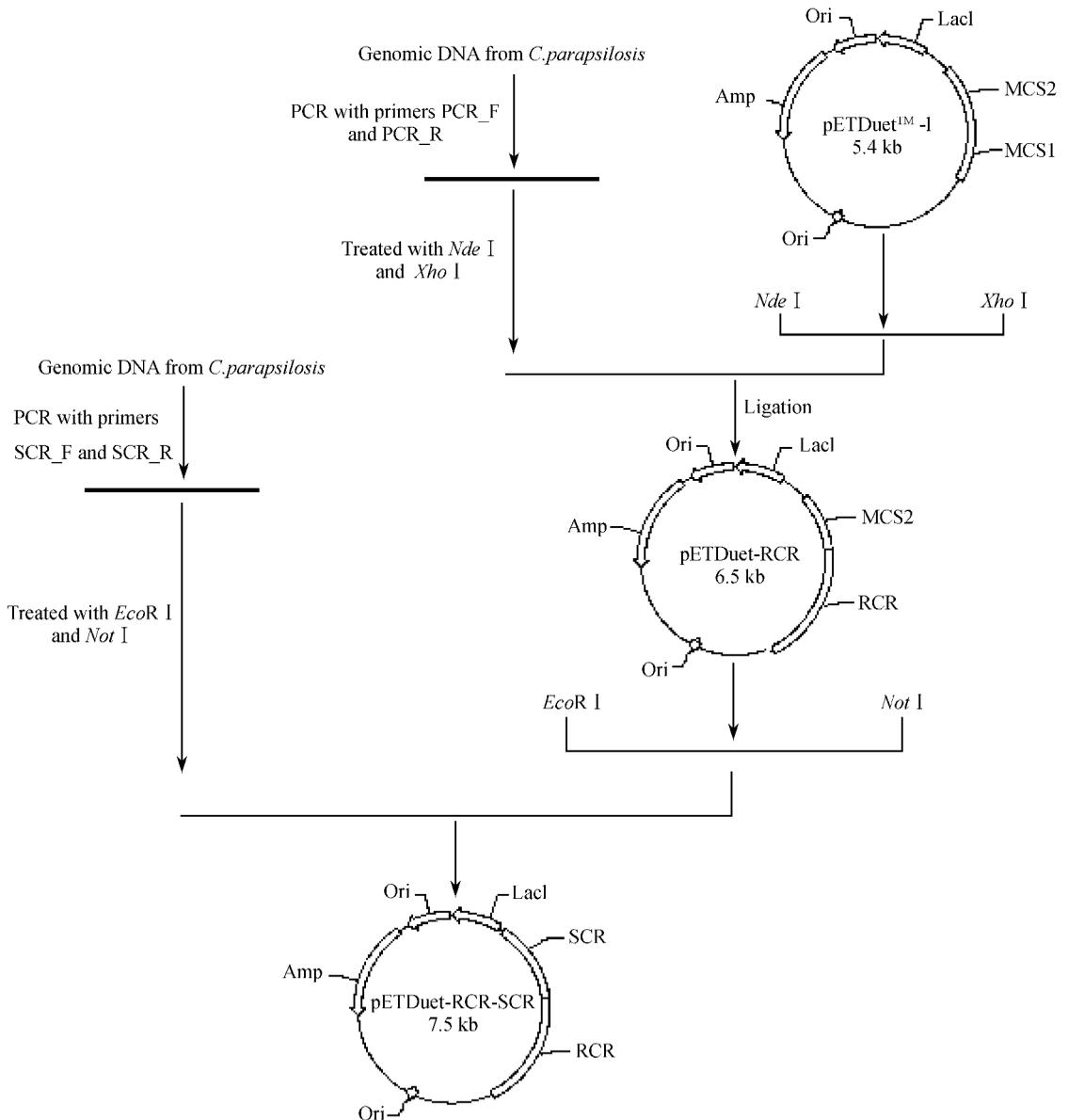


图 2 重组质粒 pETDuet-*rcr*-*scr* 的构建示意图

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pETDuet-*rcr*-*scr*.

纯化。对纯化后的 *rcr* 基因和 pETDuetTM-1 载体分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行酶切,酶切产物进行胶回收后,用 T4 连接酶将两者通过粘性末端进行连接。转化大肠杆菌的感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,经酶切验证,获得阳性质粒 pETDuet-*rcr*。

分别用 *Eco*R I 和 *Not* I 对纯化后的 *scr* 基因和重组质粒 pETDuet-*rcr* 进行酶切,切胶回收目的 DNA,将回收后的 *scr* 基因插入到线性化的重组质粒 pETDuet-*rcr*,转化大肠杆菌的感受态细胞 *E. coli* DH5 α 利用 Amp^r 和 Cm^r 双重抗性素的筛选得到重组质粒 pETDuet-*rcr-scr*,图 2 表示了该重组质粒的构建过程。酶切验证结果表明该重组质粒中同时插入了 *rcr* 和 *scr* 基因片段(图 3)。测序结果表明 *rcr* 和 *scr* 序列与已报道的 *C. parapsilosis* 的 (R)-和 (S)-羧基还原酶(Gene ID:DQ675534 和 DQ295067)基因序列的同源性均为 100%。

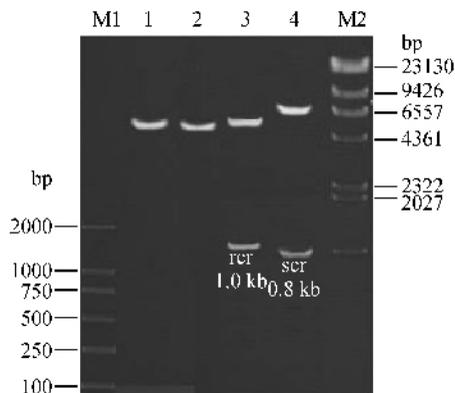


Fig.3 表达载体 pETDuet-*rcr-scr* 的酶切检测图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pETDuet-*rcr-scr* with restriction endonuclease. M1. DL2000 DNA Marker; 1. pETDuetTM-1 treated with *Nde* I/*Xho* I; 2. pETDuetTM-1 treated with *Eco*R I/*Not* I; 3. pETDuet-*rcr* treated with *Nde* I/*Xho* I; 4. pETDuet-*rcr-scr* treated with *Eco*R I/*Not* I; M2. λ DNA/*Hind*III Marker.

2.3 (R)-和(S)-专一性羧基还原酶偶联重组大肠杆菌的构建

采用化学转化的方法,将重组质粒 pETDuet-*rcr-scr* 转化入密码子优化型菌株 *E. coli* Rosetta 的感受态细胞中。用 Amp^r 和 Cm^r 的双抗性平板进行筛选,试剂盒提取质粒,经酶切和测序验证后获得阳性的表达菌株 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-scr*。当菌体培养的 OD₆₀₀ 值达到 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30 $^{\circ}$ C 下诱导培养重组菌 10 h,检测 (R)-羧基还原酶(RCR)和 (S)-羧基还原酶(SCR)是否同时获得表达。取重组菌全细胞与 5 \times 样品缓冲液混合煮沸 10 min,离心取 8 μ L 上清进行 SDS-PAGE 分析。结果显示:与 IPTG 诱导前的样品相比较,*E.*

coli Rosetta/ pETDuet-*rcr-scr* 中有两条明显的蛋白表达条带,其相对分子质量大小约为 37 kDa 和 30 kDa(图 4),与 (R)-羧基还原酶(RCR)和 (S)-羧基还原酶(SCR)分子大小正好相吻合。说明这 2 个目的酶在大肠杆菌 Rosetta 菌株中同时获得表达。

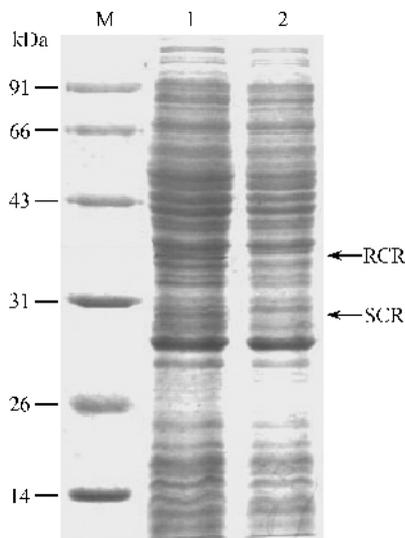


Fig.4 酶偶联体系中重组蛋白 RCR 和 SCR 的诱导表达

Fig.4 Expression of recombinant proteins of RCR and SCR in an enzyme-coupling system. M. Protein Marker; 1. *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-scr* after induction with 1 mmol/L IPTG; 2. *E. coli* Rosetta/ pETDuet-*rcr-scr* before induction.

2.4 酶偶联重组大肠杆菌的生物转化反应

前期研究结果表明近平滑假丝酵母(*C. parapsilosis*)的 (R)-羧基还原酶和 (S)-羧基还原酶催化反应的最适 pH 值不同,分别为 6.5 和 9.0^[7-8]。因而有必要对这两种酶的偶联体系的转化反应最适 pH 值进行重新选择。在 1 mL 0.1 mol/L 不同 pH 的缓冲溶液中,以 105 mmol/L 消旋苯乙二醇为底物,取 0.1 g 湿重组菌进行全细胞生物转化试验。转化结果如图 5 所示,当反应体系的 pH 值为 5.0 ~ 7.0 时,产物的光学纯度和产率随着 pH 值增加而提高,当 pH 值为 7.0 ~ 9.0 时,产物的光学纯度和产率随着 pH 值增加而明显减小,当 pH 值为 7.0,产物的光学纯度和产率达到最大值,分别为 86.6% e. e. 和 67.4%,说明该偶联体系转化反应的最适 pH 值为 7.0。

当生物转化反应体系中添加 5 mmol/L 的硫酸锌时,重组菌的转化能力增强,与未添加硫酸锌相比较,产物 (S)-苯乙二醇的光学纯度提高了约 5% e. e.,产率提高了约 9%(表 2),这表明 Zn²⁺ 能够较好地促进酶偶联体系的生物转化反应。与野生菌 *C. parapsilosis* CCTCC M203011 的转化结果相比^[12],重组大肠杆菌的生物转化获得产物 (S)-苯乙二醇的光学纯度和产率均有提高。

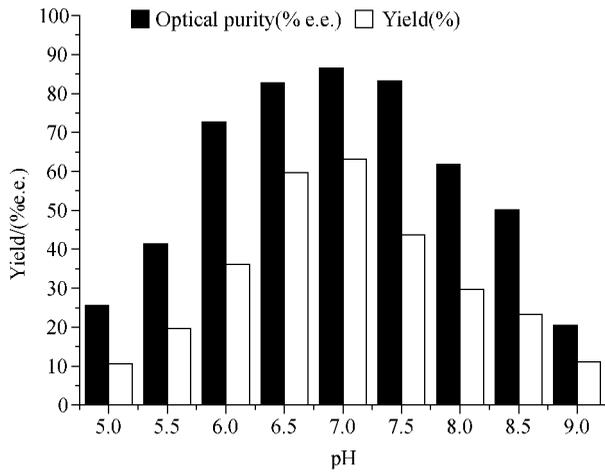


图5 不同 pH 值对转化反应效率的影响

Fig.5 Effects of different pH value on biotransformation efficiency.

表2 重组菌转化结果

Table 2 Asymmetric conversion by recombinant strains

Strain/plasmid	Optical purity / (% e. e.)	Yield / %	Zinc sulfate *
<i>E. coli</i> Rosetta/pETDuet TM -1	4.3	3.2	-
	5.0	3.4	+
<i>E. coli</i> Rosetta/pETDuet-rcr-scr	86.6	67.4	-
	91.3	75.9	+

* Notes: "+" adding 5 mmol/L zinc sulfate; "-" Without adding zinc sulfate.

3 讨论

本研究将(*R*)-羧基还原酶基因(*rcr*)和(*S*)-羧基还原酶基因(*scr*)串联于共表达载体 pETDuetTM-1 中,阳性质粒转化稀有密码子优化型的表达菌株 *E. coli* Rosetta,实现了两个酶在大肠杆菌中的高效共表达。功能验证试验表明(*R*)-羧基还原酶(RCR)与(*S*)-羧基还原酶(SCR)在大肠杆菌中成功偶联,或者说它们的生物催化功能获得了功能性整合。重组菌催化 105 mmol/L 底物(*R*)-苯乙二醇时,获得产物(*S*)-苯乙二醇,光学纯度和产率分别为 91.3% e. e. 和 75.9%。前期的研究结果表明产物(*S*)-苯乙二醇的制备需要(*R*)-羧基还原酶(RCR)与(*S*)-羧基还原酶(SCR)的同时参与,且这两种酶在催化效率上具有一定差异^[7-8,13]。当(*R*)-羧基还原酶(RCR)与(*S*)-羧基还原酶(SCR)的酶偶联体系中加入 5 mmol/L Zn²⁺ 时,在相同反应条件下,产物的光学纯度和产率比未添加 Zn²⁺ 前分别提高了约 5% e. e. 和 9%,与孙莹等前期研究结果相吻合^[5]。这很可能是因为(*R*)-羧基还原酶(RCR)是一种中链脱氢酶,Zn²⁺ 是其催化中心所必需的金属元素^[14],当(*R*)-羧

基还原酶(RCR)与(*S*)-羧基还原酶(SCR)的酶偶联体系加入一定的 Zn²⁺ 时,大大加强了(*R*)-羧基还原酶(RCR)催化(*R*)-苯乙二醇的功能,因而较好地促进了酶偶联体系的生物催化反应,提高了转化效率。

本研究采用基因工程的方法,构建了(*R*)-羧基还原酶和(*S*)-羧基还原酶的酶偶联体系,该体系成功整合了两种目标酶的生物转化功能,实现了一步法从(*R*)-苯乙二醇到(*S*)-苯乙二醇的手性转变,大大简化了手性醇的生物制备过程和降低了制备成本。同时由于转化体系中添加了“功能性元素”(Zn²⁺)^[14],强化了较弱的(*R*)-羧基还原酶的催化性能^[9],使得该酶与(*S*)-羧基还原酶在功能上趋于平衡,较好地实现了高底物浓度下手性化合物(*S*)-苯乙二醇的生物转化,为重组菌工业化生产手性醇提供了一个新思路。

参考文献

- [1] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409(1): 258-268.
- [2] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, et al. Resolution of 1-phenyl-1, 2-ethanediol by enantioselective oxidation overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51: 544-550.
- [3] Andreas L, Murillo VF. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(6): 595-603.
- [4] Hummel W. Reduction of acetophenone to (*R*)-(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1990, 34: 15-19.
- [5] 孙莹, 张荣珍, 徐岩. (*R*)-专一性羧基还原酶与甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)* 2008, 49(12): 1629-1633.
- [6] Yun H, Yang YH, Cho BK, et al. Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (*R*)-1-phenylethanol and (*R*)- α -methylbenzylamine from racemic α -methylbenzylamine using ω -transaminase/ alcohol dehydrogenase/ glucose dehydrogenase coupling reaction. *Bionotechnology Letters*, 2003, 25: 809-814.
- [7] 聂尧, 徐岩, 王海燕等. 重组大肠杆菌不对称还原 2-羟基苯乙酮合成(*R*)-苯基乙二醇. *化工进展(Chemical Industry and Engineering Progress)*. 2006, 25(10): 1231-1236.
- [8] 羊明, 徐岩, 穆晓清, 等. 一种新的高立体选择性羧基还原酶的性质及分离. *化工进展(Chemical Industry and Engineering Progress)* 2006, 25(9): 1082-1088.

- [9] Mu XQ, Xu Y. Steady state kinetics of the oxidation of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43: 23-28.
- [10] Nie Y, Xu Y, Yang M, et al. A novel NADH-dependent carbonyl reductase with unusual stereoselectivity for (R)-specific reduction from an (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol-producing micro-organism: purification and characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44: 555-562.
- [11] Nie Y, Xu Y, Mu XQ, et al. Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3759-3764.
- [12] Mu XQ, Xu Y, Nie Y, et al. *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 and the optimization of fermentation medium for stereoinversion of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol. *Process Biochemistry*, 2005(40): 2345-2350.
- [13] 许娜, 王海燕, 聂尧, 等. 近平滑假丝酵母(R)羧基还原酶基因的克隆与表达, 微生物学通报 (*Microbiology*), 2006, 33(4): 112-118.
- [14] Nordling E, Jornvall H, Persson B. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 4267-4276.

Construction of an enzyme-coupled system consisting of (R)- and (S)- specific carbonyl reductases for one-step preparation of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol

Rongzhen Zhang, Yan Xu, Ying Sun, Yawei Geng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract [Objective] To prepare (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by a one-step method, we constructed an enzyme coupled system consisting of (R)- and (S)- specific carbonyl reductases in *Escherichia coli*. **[Methods]** The genes coding (R)- and (S)- specific carbonyl reductases from *Candida parapsilosis* were inserted into a co-expression vector pETDuetTM-1. The positive plasmid was transformed into codon optimized *E. coli* Rosetta and an enzyme-coupled recombinant strain *E. coli* Rosetta / pETDuet-*rcr-fdh* was constructed. When the *OD*₆₀₀ value of the culture reached 0.6-0.8, IPTG with a final concentration of 1 mmol/L was added to induce both target proteins at 30 °C for 10 h. **[Results]** SDS-PAGE analysis showed that two target enzymes were expressed simultaneously with the relative molecular weights of 37 kDa and 30 kDa. When 5 mol/L Zn²⁺ was added into a phosphate buffer (pH7.0), the biotransformation results showed that the product (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol was produced with the optical purity of 91.3% enantiomeric excess and a yield of 75.9% by *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-scr*. **[Conclusion]** The functions of two redox enzymes were integrated by molecular recombinant technique and a one-step method for preparation of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol was developed through an enzyme-coupled system. The method may supply a new procedure in chiral alcohols preparation.

Keywords: Carbonyl reductase (CR); molecular recombinant technique; enzyme-coupled system; biotransformation; (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716008), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z226, 2006AA020104), the National Natural Science Foundation of China (20776060) and the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0498)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

Received: 19 September 2008 / Revised: 28 October 2008

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>